

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 5 月 16 日 (16.05.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/38128 A1

(51) 国際特許分類: A61K 9/127, 47/30, B01J 13/04

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/09828

(22) 国際出願日: 2001 年 11 月 9 日 (09.11.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2000-344459
2000 年 11 月 10 日 (10.11.2000) JP

(TAKEOKA, Shinji) [JP/JP]; 〒158-0094 東京都世田谷区玉川3丁目40番16号 フォレスト玉川404号 Tokyo (JP). 宗慶太郎 (SOU, Keitaro) [JP/JP]; 〒171-0031 東京都豊島区目白3丁目13番18号 ウィング目白402号 Tokyo (JP). 遠藤太郎 (ENDO, Taro) [JP/JP]; 〒206-0034 東京都多摩市鶴牧4丁目5番7号401 Tokyo (JP). 内藤社康 (NAITO, Yoshiyasu) [JP/JP]; 〒244-0801 神奈川県横浜市戸塚区品濃町1803-27-A-518 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 弁理士 西澤利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒150-0042 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): JP, US.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama (JP).

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 土田英俊 (TSUCHIDA, Eishun) [JP/JP]; 〒177-0053 東京都練馬区関町南2丁目10番10号 Tokyo (JP). 武岡真司

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD FOR PREPARING MICROSOME DISPERSION

(54) 発明の名称: 小胞体分散液の製造方法

(57) Abstract: A method for preparing a microsome dispersion wherein a water-soluble substance is encapsulated in the microsome, which comprises carrying out, in this order, a step of dispersing at least one lipid in an aqueous medium to form a microsome dispersion, a step of drying the microsomes into dried microsomes, a step of dispersing said dried microsomes in an aqueous solution of the above water-soluble substance, and a step of passing the resultant microsome dispersion through a filter. The method allows the preparation of microsomes containing a useful substance of a high concentration encapsulated therein and having a narrow particle diameter distribution, in high efficiency and high yield with safety and with simplicity and ease.

(57) 要約:

少なくとも一種以上の脂質を水性媒体に分散させる工程と、得られた小胞体を乾燥して乾燥小胞体とする工程と、該乾燥小胞体を前記水溶性物質の水性溶液に分散させる工程と、得られた小胞体分散液をフィルターに透過させる工程を順に行い、高効率で高濃度の有用物質を封入でき、均一な粒子径を有する小胞体を高い収率で、安全に、かつ簡便に製造する方法を提供する。

WO 02/38128 A1

明 細 書

小胞体分散液の製造方法

技術分野

この出願の発明は、小胞体に薬剤、生理活性物質、ヘモグロビンなどの有用物質を効率良く封入させ、粒子径を揃えた小胞体の分散液を短時間で簡便に製造する方法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、製造時間の短縮や収率の増大が可能で、有機溶媒や界面活性剤などを使用せずに粒子径を制御でき、医薬品、化粧品、食品などの分野において、安全に小胞体を大量製造できる小胞体分散液の製造方法に関するものである。

背景技術

内水相に有用物質を封入させた小胞体やその分散液は、医薬品、化粧品、食品などの様々な分野において重要な技術である。特に粒子径や被覆層数の均一化、内包効率の向上、小胞体の高収率化は、小胞体製品の量産に必要不可欠な課題である。また、前記の各分野においては、製品の安全性も必須の条件であるが、とくに、静注用製剤等の医薬品として利用される場合には、小胞体の粒子径や有用物質の封入量などが厳密に規格化されることが要求される。

しかし一般的に生体において使用される水性媒体中では、二分子膜を構成する脂質成分は分散し難く、粒子径分布が広い多重層小胞体を形成するという問題があった。そこで、何らかの手法で粒子径を均一に揃え、有用物質の封入効率を向上させる必要があった。

小胞体に目的物質を封入する方法としては、これまで、封入させたい物質を溶解した水溶液に超音波照射、強制攪拌（ホモジナイザー）、ボルトエクスマキサーにより脂質を分散させて小胞体分散液とする等の様々な方法が報告、実施されてきた。しかしこれらの方法は、いずれも、封

入効率が低く、得られる小胞体の粒子径分布も広いものであった。

封入効率が高く、高分子物質の封入に好適である方法としては、封入させたい物質を溶解した水溶液に脂質を機械的攪拌によって分散させ、凍結と融解を繰り返すことにより小胞体分散液とする凍結融解法が知られているが、溶質濃度が高い場合には、溶質の凍結保護作用により凍結融解の効果が得られないという問題があった。（この出願の発明者らは、高濃度ヘモグロビン溶液（35 g / d L）について小胞体分散液の凍結融解を試みたが、粒子径分布や封入効率に全く変化が認められず、効果がないことが確認された。）

一方、封入効率が比較的高く、粒子径を制御しやすい方法としては、揮発性有機溶媒に溶解させた脂質溶液を、封入させたい物質の水溶液に注入し、該有機溶媒を揮発させて小胞体分散液とする有機溶媒注入法、界面活性剤と脂質の混合ミセルから透析などの方法により界面活性剤を除去する界面活性剤除去法、水と混和しない有機溶媒に脂質を溶かし、少量の水性媒体を加えて超音波照射などにより w / o エマルジョンを形成し、減圧下で有機溶媒を除去する逆相蒸発法などが挙げられる。しかし、これらの方法は、いずれも有機溶媒や界面活性剤を使用するため、封入させたい物質、特に蛋白質において、変性や分解が起こりやすい。更に、調製後にこれらを完全に除去することが困難であるなど、安全性の面で問題が多い。

そこで、小胞体分散液における粒子径を均一に制御する好適な方法として、フレンチプレス、加圧ろ過器、あるいはエクストルーダー等を用いて、小胞体分散液を一定の大きさの孔に透過させる押出し法が報告された（特表昭61-502452）。しかし、高濃度ヘモグロビン溶液に脂質を分散させた系にこのような押出し法を適用した場合には、透過速度が激減し、フィルターの目詰まりが発生しやすく、フィルター交換が頻繁に必要となるため、コスト高や操作の煩雑さという新たな問題が生じた。そのため、小胞体分散液の量産には好適とはいい難かったのである。これまで、界面活性剤を混合した脂質粉末をヘモグロビン溶液に分

散し、界面活性剤を除去してヘモグロビン小胞体を調製する方法、脂質粉末をヘモグロビン溶液に分散して脱水した後、再分散させてヘモグロビン小胞体を調製する方法、ヘモグロビン溶液に混合脂質を分散させた溶液を細隙から高圧吐出させて粒子径をある程度制御したヘモグロビン小胞体を得る方法など、フィルターを使用せずに高濃度ヘモグロビンを封入した小胞体の分散液を得る方法が多数検討されてきた。

さらに、有機溶媒または界面活性剤を使用せず、また封入物質の乾燥を伴わないため蛋白質などの不安定な物質の封入に適した方法としては、予め水性媒体中で小胞体を形成させ、この小胞体分散液から水性媒体を除去して得られる乾燥体を目的封入物質の水溶液に分散させる方法が報告されている（特表平8-505882）。しかし、このような乾燥体を水和させるだけでは有用物質は殆ど封入されず、強制攪拌、微小流動体化（マイクロフルイダーザー）、超音波照射などによる再構成が必要で、それにより粒子径の制御が困難となってしまう。また、前記の有機溶媒注入法により小胞体構成成分を水性溶液に分散させ、凍結乾燥した混合脂質をこの水性溶液に分散させた小胞体分散液は、押出し法によるフィルターの目詰まりを起こさないことが知られている（特開平9-87168）。しかし、有機溶媒を使用するため、安全性の面で静注用製剤の製造には適していない。

したがって、最終目的とする小胞体の粒子径、封入効率、フィルター透過性を考慮した前調製の条件設定はなされていない。

この出願の発明者らは、ヘモグロビン等の有用物質を封入した小胞体分散液を静注用製剤として利用するためには、厳密な粒子径の制御と、高い安全性が要求される点を考慮し、界面活性剤や有機溶媒を添加せずに粒子径の厳密な制御が可能な押出し法を基に最適な手法について検討を重ねてきた。

高濃度、高純度のヘモグロビン溶液に混合脂質乾燥体を分散させ、これを均一孔径のフィルターに順次透過させてヘモグロビン小胞体を製造する方法は、前記のとおり、高濃度ヘモグロビン溶液自体の高粘性と

操作中に僅かに生じるヘモグロビン変性体により、透過速度が低下しやすく、目詰まりが起こりやすかった。そのため、フィルター透過に長時間を要し、効率化のために膜面積を増大させた場合には、フィルターの細孔に残存する分散液が多くなり、収率が低下するという問題があった。さらに、分散液を孔径の異なるフィルターに順次透過させるため、必要なフィルターの種類も多く、フィルター交換が煩雑となり、さらなる収率の低下やコストの増大に繋がった。

発明の開示

この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、従来技術の問題点を解決し、高効率で高濃度の有用物質を封入でき、均一な粒子径を有する小胞体を高い収率で、安全に、かつ簡便に製造する方法を提供することを課題としている。

図面の簡単な説明

図1は、この発明の実施例において、この発明の小胞体分散液の製造方法におけるヘモグロビン小胞体分散液のフィルター透過速度を示した図である。

図2は、この発明の実施例において、従来の小胞体分散液の製造方法におけるヘモグロビン溶液のフィルター透過速度を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

この出願の発明は、以上のとおりの課題を解決するものとして、第1には、水溶性物質を小胞体に封入し、小胞体の粒子径を制御する小胞体分散液の製造方法であって、少なくとも一種以上の脂質を水性媒体に分散させる工程と、得られた小胞体を乾燥して乾燥小胞体とする工程と、該乾燥小胞体を前記水溶性物質の水性溶液に分散させる工程と、得られた小胞体分散液をフィルターに透過させる工程を順に行う小胞体分散液の製造方法を提供する。

この出願の発明は、第 2 には、前記第 1 の発明の小胞体分散液の製造方法において、一種以上の脂質を水性媒体に分散させる工程と、得られた小胞体を乾燥して乾燥小胞体とする工程との間に 1 回以上の凍結融解操作を行う小胞体分散液の製造方法を提供する。

第 3 には、この出願の発明は、前記第 1 および第 2 の発明において、脂質の一種がポリエチレングリコール型脂質である小胞体分散液の製造方法を提供する。

さらに、第 4 には、この出願の発明は、前記ポリエチレングリコール型脂質の濃度が 0.01 ~ 1 モル % である小胞体分散液の製造方法を提供する。

この出願の発明は、また、第 5 には、乾燥小胞体が、小胞体を凍結乾燥して得るものである小胞体分散液の製造方法、第 6 には、乾燥小胞体が、小胞体を噴霧乾燥して得られるものである小胞体分散液の製造方法を提供する。

第 7 には、この出願の発明は、前記第 1 ~ 6 の発明において、水溶性物質が、ヘモグロビンおよびストローマフリーヘモグロビンからなる群より選択される小胞体分散液の製造方法を、そして、第 8 には、ヘモグロビンまたはストローマフリーヘモグロビンの水性溶液の濃度が 10 ~ 50 g/dL である小胞体分散液の製造方法をも提供する。

この出願の発明の小胞体分散液の製造方法では、小胞体の膜構成脂質は、水性媒体中で二分子膜構造を形成しうる種々の両親媒性分子から選択される一種以上の脂質とする。好ましくは天然または合成の飽和リン脂質、不飽和リン脂質、およびこれらの組合せである。

飽和リン脂質としては、水添卵黄レシチン、水添大豆レシチンなどの天然リン脂質やその誘導体、ジミリストイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリンなどが例示される。また、不飽和リン脂質としては、卵黄レシチン、大豆レシチン、1,2-ビス(2,4-オクタデカジエノイル)-sn-グリセロール-3-ホスフォコリン、1,2-ビス-(8,10,12-

オクタデカトリエノイル) - sn - グリセロ - 3 - ホスフォコリンなどの重合性基を有する重合性リン脂質が例示される。このとき、重合性リン脂質は、非重合性の長鎖を有していてもよく、非重合性の長鎖としては、炭素数 2 ~ 24 の直鎖あるいは分岐鎖のアルキル基、アシル基、非重合性アルケニル基、非重合性アルケノイル基などが挙げられる。

小胞体の膜構成脂質として、とくに好ましくは、ポリエチレングリコール型脂質を含有する混合脂質である。ポリエチレングリコール鎖は、乾燥小胞体を水性溶液に分散させる後の工程において小胞体の粒子径変化を抑制する効果が高く、また、凝集を抑制するため、最終工程で押出し法を行う際に、小胞体の凝集によるフィルター透過性の低下や目詰まりを防止でき好ましい。ポリエチレングリコール型脂質の含有量としては、混合脂質の 0.01 ~ 1 モル% とすることが好ましいが、より好ましくは 0.1 ~ 0.3 モル% である。0.1 モル% より少ない場合は凝集抑制効果が弱くなり、また 0.3 モル% より多い場合は小胞体内相に伸びたポリエチレングリコール鎖の排除体積効果により水溶性物質の封入効率が低下する傾向があるためである。さらに、ポリエチレングリコールの分子量は 2,000 ~ 12,000 程度とすることが好ましい。

この出願の発明の小胞体分散液の製造方法では、小胞体の膜構成脂質として、負電荷脂質を有していてもよく、例えば、ジアシルホスファチジルグリセロール、ジアシルホスファチジン酸、ジアシルホスファチジリンイノシトール、ジアシルホスファチジルセリン、脂肪酸等が好ましく使用できる。このとき、負電荷脂質の含有量はとくに限定されないが、1 ~ 50 モル% であることが好ましく、より好ましくは 5 ~ 20 モル% とする。負電荷脂質の含有量が 1 モル% 未満である場合には封入効率が低下したり、小胞体の凝集が発生しやすくなり、50 モル% 以上の場合には、小胞体膜が不安定となる場合があり好ましくない。

さらに、この出願の発明の小胞体分散液の製造方法では、小胞体の膜構成脂質として用いられる脂質成分として、安定化剤を添加していてもよい。このような安定化剤としてはステロール類が好ましく、具体的に

は、エルゴステロール、コレステロール等が挙げられるが、好ましくはコレステロールである。コレステロールの含有量はとくに限定されないが、小胞体膜を効果的に安定化するためには、20～60モル%とすることが好ましい。

この出願の発明の小胞体分散液の製造方法では、「前調製」として、以上のとおりの一種以上の脂質を水性媒体に分散し、予め小胞体を形成する。このような前調製では、例えば、混合脂質粉末に水性媒体を加えて脂質粉末を水和、膨潤させた後、静置したり、ボルテックスミキサー、強制攪拌機、超音波照射機、ホモジナイザー、マイクロフルイダイザー、高圧押出し機（エクストルーダー）、凍結融解などにより脂質を分散させ小胞体を得ることができる。中でも凍結融解法は被覆層数を有効に減少でき、フィルターの透過性が著しく向上するため、好ましい。水性媒体中の脂質を分散させ、小胞体を前調製する方法は、これらの方法に限定されないが、有機溶媒注入法、界面活性剤除去法、逆送蒸発法、有機溶媒小球蒸発法などは残存物を完全に除去するのが困難であるため好ましくない。

前調製において得られる小胞体は、後の工程を経てその粒子径が1.3～4倍縮小されることが発明者らの鋭意研究により明らかになっている。したがって、前調製においては、小胞体の粒子径は、最終的に目標とする小胞体の粒子径の1.3～4倍とすることが好ましい。目標とする小胞体の粒子径は、小胞体分散液の用途に応じて変更でき、とくに限定されないが、例えば、ヘモグロビン含有小胞体分散液を静注製剤として用いる場合には、最終的な小胞体の粒子径は、70nm～300nmであることが好ましい。

このように前調製の段階で小胞体の粒子径をある程度制御する方法としては、種々のものが例示される。例えば、市販の脂質粉末を1～5g/dLの濃度で水性媒体に添加し、室温で静置することによって0.5～300μmの多重層小胞体得られる。この小胞体分散液をボルテックスミキサーで5分程度処理すれば0.3～3μmの多重層小胞体得

られ、プローブ型超音波照射機により相転移温度以上で5分間処理すれば20～200nmの粒子径を有する小胞体を得られる。また、室温静置で得られた多重層小胞体を高圧押出し機に透過させれば、使用する分散液の濃度とフィルターの細孔の大きさに応じた粒子径分布の狭い任意の粒子径の小胞体を得ることができる。例えば、1～10g/dL程度の脂質濃度で、0.03～3μmの細孔径を有するフィルターを用いることにより最終的に透過させるフィルターの細孔径に応じた粒子径に調整できる。

以上のとおりの方法により前調製された小胞体分散液は、さらに粒子径分布を小さくするために、種々の方法により分画分取されてもよい。例えば超遠心分離、ゲル濾過などが考慮される。このようにして前調製された小胞体の粒子径は、様々な公知の方法によって測定できる。例えば動的光散乱法、電子顕微鏡法などが適用できる。

この出願の発明の小胞体分散液の製造方法では、水性媒体としては、純水、水溶液、緩衝溶液などが考慮される。小胞体分散液の用途に応じて適宜選択できるが、好ましくは生体において安全性の高い注射用水や生理食塩水である。

この出願の発明の小胞体分散液の製造方法では、前調製された小胞体を乾燥して乾燥小胞体とする。このとき、乾燥方法は、減圧乾燥、凍結乾燥、噴霧乾燥（スプレードライ）、クラックスなど、どのようなものであってもよく、とくに限定されないが、水性媒体を除去した後も小胞体構造を保持するためには、急冷凍結後に水分を除去する凍結乾燥法や小胞体分散液を噴霧して急激に乾燥する噴霧乾燥法が好ましい。もちろん、小胞体構造が保持されるものであれば、これらの方法に限定されない。

この出願の発明の小胞体分散液の製造方法では、次に、前調製された小胞体を乾燥して得られる乾燥小胞体を小胞体中に封入したい水溶性物質の水溶液に添加する。前調製で得られた乾燥小胞体は、親水基を外側に向けた配向をとっているため、激しい攪拌や加熱などを行わなくても、水溶性物質の水溶液に短時間で完全に分散できる。

このとき、水溶性物質は、例えば種々の医薬品や医薬品の前駆体などの合成物質、ヘモグロビンや酵素などの天然物質、植物からの抽出物など様々なものが考慮される。例えば、ヘモグロビン溶液を用いれば、得られる小胞体分散液は人工酸素運搬体として好ましいものとなり得る。このようなヘモグロビン溶液としては、ヒト由来、ウシ由来の赤血球を常法によって溶血し、遠心分離や限外濾過によりストローマ成分のみを除去したストローマフリーヘモグロビン溶液、あるいはその溶液からヘモグロビンを単離した精製ヘモグロビン溶液、あるいはリコンビナントヘモグロビン溶液で、限外濾過により 10 g/dL 以上に濃縮したものが使用される。酸素運搬体として充分量の酸素を生体組織に供給するためにはヘモグロビン濃度を $20\sim 50\text{ g/dL}$ とすることが好ましい。

さらに、小胞体に封入させる水溶性物質は、一種に限定されず、様々な物質の組み合わせであってもよい。例えば、ヘモグロビン溶液を封入する場合には、イノシトールリン酸、ピリドキサル5'リン酸などの有機リン化合物を添加し、ヘモグロビンの酸素親和度を調節してもよい。また、ヘモグロビンの還元剤としてシステイン、ホモシステイン、グルタチオンなどのチオール類やアスコルビン酸など水溶性ビタミン類などを加えてもよい。さらには、活性酸素除去剤として、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼを加えることも考慮される。

この出願の発明の小胞体の製造方法では、前調製した乾燥小胞体を水溶性物質の水溶液に再分散させると、粒子径がやや増大する傾向が見られる。このような増大はもとの粒子径の30%以内であり影響は大きくないが、前記のとおり小胞体の膜構成脂質として、ポリエチレングリコール型脂質を含有する場合、ポリエチレングリコール鎖が保護剤として作用するため、このような粒子径の変化は殆ど起こらない。

この出願の発明の小胞体分散液の製造方法では、水溶性物質の水溶液に前記の乾燥小胞体を分散させた後、得られる小胞体分散液を高圧下で均一孔径のフィルターに透過させる。このような押し出し法を用いることにより、水溶性物質の小胞体への封入がより効率よく進行し、同時に、

小胞体の粒子径を均一化できる。

このとき用いられるフィルターは、耐水性があり、目的とする小胞体の粒子径に対応する細孔径を有するものであれば単独あるいはそれよりも大きい細孔径を有するフィルターを組合わせて用いられる。例えば、膜面積 3.1 cm^2 の EXTRUDER (登録商標) (商品名、日油リポソーム製) を用いることができる。添加する試料の量は膜面積等に応じて適宜選択できる。また、圧力もとくに限定されず、膜が破碎しない限り、好ましい透過速度を維持できる圧力を選択すればよい。一般的には、 20 kg/cm^2 以下の圧力が用いられる。

前記のとおり、フィルター透過により最終的に得られる小胞体の粒子径は、前調製された小胞体の粒子径の $1/3 \sim 1/4$ 倍小さくなる。したがって、この点を考慮して前調製される小胞体の粒子径を設定する必要がある。 $1/3$ 倍より小さい粒子を前調製した場合には、フィルター透過工程において、小胞体がフィルターを素通りするため、小胞体の再構成が行われず、封入効率が增大しない。また、 $1/4$ 倍より大きな粒子を前調製した場合には、フィルター透過率が低下し、フィルターが詰まりやすくなるため、処理工程が増え、小胞体分散液の大量製造には適さない。

この出願の発明の小胞体分散液の製造方法は、以上のとおりのものであるが、前記のとおりの前調製工程と乾燥工程、乾燥小胞体を水溶性物質の水性溶液に添加する工程、得られた小胞体分散液をフィルターに透過させる工程以外に、凍結融解、攪拌、加熱などの操作を含んでもよい。また、小胞体に封入されずに残存した水溶性物質を超遠心分離、ゲルろ過担体を充填したカラム、限外濾過膜などにより除去してもよい。さらに、フィルター透過工程では、フィルターは1種に限定されず、同一細孔径のフィルターを繰り返し用いてもよいし、細孔径の異なる種々のものを用いて順次小胞体の粒子径を小さくしてもよい。

以下、添付した図面に沿って実施例を示し、この発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、この発明は以下の例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることは言う

までもない。

実 施 例

以下の実施例および比較例において、ヘモグロビンの封入効率は未封入ヘモグロビンを除くして得られたヘモグロビン封入小胞体分散液中のヘモグロビン重量 (A) を総脂質重量 (B) で除した数値 (A/B) として測定した。従って A/B の数値が大きい程ヘモグロビン封入効率は高いといえる。

ヘモグロビン重量はシアノメトヘモグロビン法、総脂質重量は過マンガン酸塩灰化法によるリン定量や酵素的測定法によるコレステロール定量から算出できるが、ここでは市販されている定量キットを用いた。

フィルター透過性は、膜面積 3.1 cm^2 の EXTRUDER (登録商標) (商品名、日油リボソーム製) に試料分散液を 5 mL 導入し、一定圧 (20 kg/cm^2) で加圧しながら透過液を目盛付きシリンダーに受け、液面の上昇速度をビデオ撮影して評価した。

<実施例 1>

小胞体膜構成物質として、ジパルミトイルホスファチジルコリン 144 mg (0.2 mmol)、コレステロール 76 mg (0.2 mmol)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール 29 mg (0.04 mmol) からなる混合脂質を注射用水 5 mL に分散させ、 25°C で攪拌して多重層小胞体分散液を得た。この分散液を液体窒素で凍結し 25°C で融解させる凍結融解サイクルを 3 回繰り返し、粒径 500 nm の小胞体分散液を得た。この小胞体分散液を噴霧乾燥し、乾燥小胞体を得た。得られた乾燥小胞体をヘモグロビン溶液 5 mL (35 g/dL) に添加し、 25°C で 2 時間攪拌した。これを EXTRUDER (登録商標) (商品名、日油リボソーム製) に加え、加圧 (20 kg/cm^2) しながら 14°C で孔径 $3.0 \mu\text{m}$ 、 $0.8 \mu\text{m}$ 、 $0.65 \mu\text{m}$ 、 $0.45 \mu\text{m}$ 、 $0.30 \mu\text{m}$ 、 $0.22 \mu\text{m}$ のアセチルセルロースフィルター (富士フイルム製) に順次透過させた。

いずれのフィルターにおいても目詰まりは起きず、透過性は良好であった。

作成した試料について超遠心分離（100,000g、60分）を3回繰り返し、残存ヘモグロビンを除去した。こうして得られたヘモグロビン小胞体の粒子径は、動的光散乱装置（COULTER N4SD）により 255 ± 52 nmと測定された。

市販のリン定量キットおよびヘモグロビン定量キットを用いて、リン定量、ヘモグロビン定量を行った。リン定量から総脂質重量を求め、ヘモグロビン重量を総脂質重量で除してヘモグロビン／総脂質比を算出したところ、1.7と算出された。

<比較例1>

実施例1と同様の方法で小胞体を前調製した後、噴霧乾燥を行わずに超遠心分離（300,000g、60分）にて小胞体を沈殿させ、上澄みを除いてヘモグロビン溶液5 mL（35 g/dL）に分散させた。

これを EXTRUDER（登録商標）（商品名、日油リポソーム製）に加え、加圧（20 kg/cm²）しながら14℃で孔径3.0 μm、0.8 μm、0.65 μm、0.45 μm、0.30 μm、0.22 μmのアセチルセルロースフィルター（富士フィルム製）に順次透過させた。

いずれのフィルターにおいても透過性は良好であった。

作成した試料について超遠心分離（100,000g、60分）を3回繰り返し、残存ヘモグロビンを除去した。こうして得られたヘモグロビン小胞体の粒子径は、動的光散乱装置（COULTER N4SD）により 250 ± 50 nmと測定された。

市販のリン定量キットおよびヘモグロビン定量キットを用いて、リン定量、ヘモグロビン定量を行った。リン定量から総脂質重量を求め、ヘモグロビン重量を総脂質重量で除してヘモグロビン／総脂質比を算出したところ、0.8と算出された。

表1に実施例1および比較例1のヘモグロビン／総脂質比を示した。

表 1

試 料	フィルター透過性	最終粒子径 (nm)	ヘモグロビン／総脂質比 (重量／重量)
実施例 1	良 好	255±52	1.7
比較例 1	良 好	250±50	0.8

表 1 より、小胞体分散液の製造において、乾燥小胞体を得る工程を含まない場合（比較例 1）、乾燥小胞体を得る工程を含んだ場合（実施例 1）と同様にフィルター透過性は良好であることが分かった。しかし、乾燥小胞体を得る工程を含まないことにより、エクストルージョンによる封入効率は低下することが示された。これは、最初に小胞体を作製する際に使用した水性媒体が小胞体内相に残存するためと考えられる。

＜実施例 2＞

小胞体膜構成物質として、ジパルミトイルホスファチジルコリン 432 mg (0.6 mmol)、コレステロール 228 mg (0.6 mmol)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール 87 mg (0.12 mmol) からなる混合脂質を注射用水 15 mL に分散させ 25℃ で攪拌し多重層小胞体分散液を得た。この溶液を 5 mL ずつ 3 つに分注し、(a) 前処理による粒子径調製を行わない系、

(b) エクストルージョンにより粒子径を 500 nm に調製した系、
(c) エクストルージョンにより粒子径を 250 nm に調製した系として、液体窒素で凍結後、凍結乾燥機に装着し、12 時間凍結乾燥して乾燥小胞体を得た。

各々の試料についてストローマフリーヘモグロビン溶液 5 mL (35 g/dL) を添加し、14℃ で 2 時間攪拌してヘモグロビン小胞体分散液を得た。

これを EXTRUDER (登録商標) (商品名、日油リポソーム製) に加え、加圧 (20 kg/cm²) しながら 14℃ で孔径 3.0 μm、0.8 μm

m、0.65 μ m、0.45 μ m、0.30 μ m、0.22 μ mのアセチルセルロースフィルター（富士フィルム製）に順次透過させた。

いずれのフィルターにおいても目詰まりは起きず、透過性は良好であった。

作成した試料について超遠心分離（100,000g、60分）を3回繰り返し、残存ヘモグロビンを除去した。こうして得られたヘモグロビン小胞体の粒子径は、動的光散乱装置（COULTER N4SD）にて測定した。

市販のリン定量キットおよびヘモグロビン定量キットを用いて、リン定量、ヘモグロビン定量を行った。リン定量から総脂質重量を求め、ヘモグロビン重量を総脂質重量で除してヘモグロビン／総脂質比を算出した。

表2に得られた小胞体のフィルター透過性、粒子径、およびヘモグロビン封入効率（ヘモグロビン／脂質）を示した。

表 2

試料	前調製の粒子径 (nm)	フィルター透過性	最終粒子径 (nm)	ヘモグロビン／ 総脂質比 (重量／重量)
(a)	1800 \pm 180	低い	265 \pm 54	1.6
(b)	515 \pm 72	良好	256 \pm 51	1.7
(c)	258 \pm 512	著しく高い	250 \pm 45	0.3

前調製における粒子径（1,800nm）が目的とする粒子径（265nm）の7倍のもの（試料（a））ではフィルター透過性が低いため、より大きな孔径のフィルターを用いて押出す必要があった。前調製における粒子径（258nm）が目的とする粒子径（250nm）の1倍のもの（試料（c））ではフィルター透過性は高いものの、小胞体がフィルター細孔を素通りしたため、封入効率の低下が見られた。

一方、前調製における粒子径（515 nm）が目的とする粒子径（256 nm）の2倍のもの（試料（b））では、良好なフィルター透過性と高い封入効率を得られた。

<実施例3>

小胞体膜構成脂質として、ジパルミトイルホスファチジルコリン144 mg（0.2 mmol）、コレステロール76 mg（0.2 mmol）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール29 mg（0.04 mmol）、ジステアロイル-N-モノメトキシーポリエチレングリコール（分子量：5,000）-サクシニルホスファチジルエタノールアミン7 mg（1.3 μ mol）を秤量し、10 mLのナス型フラスコに加えた。ここにベンゼン5 mLを加え加温しながら完全溶解させた。これを液体窒素で凍結後、凍結乾燥機に装着し、12時間凍結乾燥して白色粉末を得た。これを注射用水5 mLに添加して25℃で攪拌し、粒子径1.8 μ mの小胞体分散液を得た。この小胞体分散液を液体窒素で凍結して25℃で融解させる凍結融解サイクルを4回繰返し、粒径520 nmの小胞体分散液を得た。この分散液を液体窒素で凍結後、凍結乾燥機に装着し、15時間凍結乾燥して白色乾燥小胞体を得た。

乾燥小胞体にヘモグロビン溶液5 mL（35 g/dL）を添加し、25℃で攪拌してヘモグロビン小胞体分散液を得た。この時小胞体の粒子径は540 nmであり、乾燥前の粒子径をほぼ保持していた。

これを EXTRUDER（登録商標）（商品名、日油リボソーム製）に加え、加圧（20 kg/cm²）しながら14℃で孔径3.0 μ m、0.8 μ m、0.65 μ m、0.45 μ m、0.30 μ m、0.22 μ mのアセチルセルロースフィルター（富士フィルム製）に順次透過させた。透過挙動をビデオ撮影し、各フィルターにおける透過に要する時間と透過量を測定した。

図1に透過量と時間の関係を示した。

図1に示されるように、この出願の発明の小胞体分散液の製造方法により、良好なフィルター透過性を保ったまま目的粒子径250 nmが得

られ、ヘモグロビン／総脂質比は1．7でヘモグロビンを封入させることができた。

<比較例2>

実施例3と同様の方法で小胞体を調製した後、凍結融解による粒径制御を行わずに、このものを液体窒素で凍結し、凍結乾燥機に装着し、12時間凍結乾燥して白色粉末状の乾燥小胞体を得た。

乾燥小胞体にヘモグロビン溶液5 mL (35 g / d L) を添加し、25℃で攪拌しながらヘモグロビン小胞体分散液を得た。

これを EXTRUDER (登録商標) (商品名、日油リポソーム製) に加え、加圧 (20 kg / cm²) しながら14℃で孔径3．0 μm、0．8 μm、0．65 μm、0．45 μm、0．30 μm、0．22 μmのアセチルセルロースフィルター (富士フィルム製) に順次透過させた。透過挙動をビデオ撮影し、各フィルターにおける透過に要する時間と透過量を測定した。

図2に透過量と時間の関係を示した。

図2より、前調製による粒子径の制御を行わない従来法では、各フィルターにおける透過速度が実施例3における場合と比較して低下することが示された。

<実施例4>

小胞体膜構成脂質として、ジパルミトイルホスファチジルコリン8．64 g (12．0 mmol)、コレステロール4．56 g (12．0 mmol)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール1．74 g (2．4 mmol)、ジステアロイル-N-モノメトキシーポリエチレングリコールサクシニルホスファチジルエタノールアミン0．42 g (78 μmol) からなる混合脂質を水酸化ナトリウム水溶液 ([水酸化ナトリウム] = 8 mM) 300 mL に分散させ、25℃で攪拌して多重層小胞体分散液を得た。

この小胞体分散液を液体窒素で凍結して25℃で融解させる凍結融解サイクルを4回繰返し、粒径520 nmの小胞体分散液を得た。これを

液体窒素で凍結後、凍結乾燥機に装着し、15時間凍結乾燥して白色乾燥小胞体を得た。

乾燥小胞体にヘモグロビン溶液300mL(35g/dL)を添加し、14℃で2時間攪拌して小胞体分散を得た。この分散液を150mLずつ2つに分注し、(d)膜面積45.3cm²のレモリーノ(商品名、ミリポア製)に加え、加圧(20kg/cm²)しながら14℃で孔径0.65μm、0.45μm、0.30μm、0.22μmのアセチルセルロースフィルター(富士フイルム製)を順次透過させた系、(e)マイクロフルダイザーに加え、10,000psiで10サイクルの操作を行った系とした。

各試料について超遠心分離(100,000g、60分)を3回繰返し、未内包ヘモグロビンを除去した。こうして得たヘモグロビン小胞体分散液の粒子径は、動的光散乱装置(COULTER N4SD)により測定した。市販のリン定量キット及びヘモグロビン定量キットを用いて、リン定量、ヘモグロビン定量を行い、ヘモグロビン重量を総脂質重量で除してヘモグロビン/総脂質比を算出した。

表 3

試料	粒子径制御方法	最終粒子径 (nm)	ヘモグロビン/総脂質比 (重量/重量)
(d)	押出し法(レモリーノ)	255±42	1.8
(e)	マイクロフルダイザー	221±112	1.4

表3から、粒子径調整にマイクロフルダイザーを用いることにより、比較的低い封入効率が得られ、粒子径分布が広く、サイズ分画工程が必要となるため、工程が煩雑になり、収率が低下することが示された。

一方、押出し法を用いた場合は、粒子径分布が狭い範囲に制御され、封入効率も高いことが確認された。

<実施例 5>

小胞体膜構成物質として、ジパルミトイルホスファチジルコリン 144 mg (0.2 mmol)、コレステロール 76 mg (0.2 mmol)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール 29 mg (0.04 mmol) ジステアロイル-N-モノメトキシーポリエチレングリコール (分子量: 5000) -サクシニルホスファチジリエタノールアミン 7 mg (1.3 μ mol) を秤量し、10 ミリリットルのナス型フラスコに加えた。ここにベンゼン 5 mL を加え加温しながら完全溶解させた。これを液体窒素で凍結後、凍結乾燥機に装着し、12 時間凍結乾燥して白色粉末を得た。これを注射用水 25 mL に添加して 25 °C で攪拌して多重層小胞体分散液を得た。この小胞体分散液を液体窒素で凍結して 25 °C で融解させる凍結融解サイクルを 4 回繰返し、粒径 500 nm の小胞体分散液を得た。これを液体窒素で凍結後、凍結乾燥機に装着し、15 時間凍結乾燥して白色乾燥小胞体を得た。

乾燥小胞体にヘモグロビン溶液 5 mL (35 g/dL) を添加し、25 °C で攪拌し小胞体分散ヘモグロビン溶液を得た。この時小胞体の粒子径は 520 nm であり、乾燥前の粒子径をほぼ保持していた。これを EXTRUDER (登録商標) (商品名、日油リボソーム製) に加え、加圧 (20 kg/cm²) しながら 14 °C で孔径 3.0 μ m、0.45 μ m、0.30 μ m、0.22 μ m のアセチルセルロースフィルター (富士フィルム製) を順次透過させた。何れのフィルターにおいても透過性は極めて良好であった。

<比較例 3>

小胞体膜構成物質として、ジパルミトイルホスファチジルコリン 144 mg (0.2 mmol)、コレステロール 76 mg (0.2 mmol)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール 29 mg (0.04 mmol) を秤量し、10 ミリリットルのナス型フラスコに加えた。ここにベンゼン 5 mL を加え加温しながら完全溶解させた。これを液体窒素で凍結後、凍結乾燥機に装着し、12 時間凍結乾燥して白色粉末を得た。こ

れを注射用水 2.5 mL に添加して 25℃ で攪拌し多重層小胞体分散液を得た。この小胞体分散液を液体窒素で凍結して 25℃ で融解させる凍結融解サイクルを 4 回繰返し、粒径 520 nm の小胞体分散液を得た。これを液体窒素で凍結後、凍結乾燥機に装着し、15 時間凍結乾燥して白色乾燥小胞体を得た。

乾燥小胞体にヘモグロビン溶液 5 mL (35 g/dL) を添加し、25℃ で攪拌し小胞体分散ヘモグロビン溶液を得た。この時小胞体の粒子径は 650 nm であり、乾燥前の粒子径から僅かな増大が認められた。これを EXTRUDER (登録商標) (商品名、日油リポソーム製) に加え、加圧 (20 kg/cm²) しながら 14℃ で孔径 3.0 μm、0.45 μm、0.30 μm、0.22 μm のアセチルセルロースフィルター (富士フィルム製) を順次透過させた。何れのフィルターにおいても透過性は良好であったが、ポリエチレングリコール型脂質を導入した系と比較すると 0.45 μm 以下のフィルター透過速度の低下が認められた。

<比較例 4>

小胞体膜構成物質として、ジパルミトイルホスファチジルコリン 144 mg (0.2 mmol)、コレステロール 76 mg (0.2 mmol)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール 29 mg (0.04 mmol)、ジステアロイル-N-モノメトキシ-ポリエチレングリコール (分子量: 5,000) -サクシニルホスファチジルエタノールアミン 61 mg (11.3 μmol) を秤量し、10 ミリリットルのナス型フラスコに加えた。ここにベンゼン 5 mL を加え加温しながら完全溶解させた。これを液体窒素で凍結後、凍結乾燥機に装着し、12 時間凍結乾燥して白色粉末を得た。これを注射用水 2.5 mL に添加して 25℃ で攪拌して多重層小胞体分散液を得た。この小胞体分散液を液体窒素で凍結して 25℃ で融解させる凍結融解サイクルを 4 回繰返し、粒径 500 nm の小胞体分散液を得た。ここれを液体窒素で凍結後、凍結乾燥機に装着し、15 時間凍結乾燥して白色乾燥小胞体を得た。

乾燥小胞体にヘモグロビン溶液 5 mL (35 g/dL) を添加し、2

5℃で攪拌し小胞体分散ヘモグロビン溶液を得た。この時小胞体の粒子径は500nmであり、乾燥前の粒子径を保持していた。これをEXTRUDER（登録商標）（商品名、日油リポソーム製）に加え、加圧（20kg/cm²）しながら14℃で孔径3.0μm、0.45μm、0.30μm、0.22μmのアセチルセルロースフィルター（富士フィルム製）を順次透過させた。何れのフィルターにおいても透過性は極めて良好であったが、ヘモグロビン内包効率の低下が認められた。

表4に実施例5および比較例3、4の前調製の粒子径、ヘモグロビン溶液に分散後の粒子径、フィルター透過性、ヘモグロビン／総脂質比（重量／重量）を示した。

表 4

試料 (ホリチン・ リコル型脂質 含量)	前調製の 粒子径 (nm)	ヘモグロビン 溶液に分散後 の粒子径 (nm)	フィルター 透過性	ヘモグロビン ／総脂質比 (重量／重量)
実施例 5 (0.3mol%)	500	520	極めて良好	1.9
比較例 3 (0mol%)	520	650	良好	1.8
比較例 4 (2.5mol%)	500	500	極めて良好	1.3

産業上の利用可能性

以上詳しく説明したとおり、この発明によって、高効率で高濃度の有用物質を封入でき、均一な粒子径を有する小胞体を高い収率で、安全に、かつ簡便に製造する方法が提供される。

請求の範囲

1. 水溶性物質を小胞体に封入し、小胞体の粒子径を制御する小胞体分散液の製造方法であって、少なくとも、一種以上の脂質を水性媒体に分散させる工程と、得られた小胞体を乾燥して乾燥小胞体とする工程と、該乾燥小胞体を前記水溶性物質の水性溶液に分散させる工程と、得られた小胞体分散液をフィルターに透過させる工程を順に行うことを特徴とする小胞体分散液の製造方法。
2. 一種以上の脂質を水性媒体に分散させる工程と、得られた小胞体を乾燥して乾燥小胞体とする工程との間に1回以上の凍結融解操作を行う、請求項1の小胞体分散液の製造方法。
3. 脂質の一種がポリエチレングリコール型脂質である請求項1または2のいずれかの小胞体分散液の製造方法。
4. ポリエチレングリコール型脂質の濃度が0.01～1モル%である請求項3の小胞体分散液の製造方法。
5. 乾燥小胞体は、小胞体を凍結乾燥して得る請求項1ないし4のいずれかの小胞体分散液の製造方法。
6. 乾燥小胞体は、小胞体を噴霧乾燥して得る請求項1ないし4のいずれかの小胞体分散液の製造方法。
7. 水溶性物質が、ヘモグロビンおよびストローマフリーヘモグロビンからなる群より選択される請求項1ないし6のいずれかの小胞体分散液の製造方法。
8. ヘモグロビンまたはストローマフリーヘモグロビンの水性溶液の濃度が10～50g/dLである請求項7の小胞体分散液の製造方法。

図 1

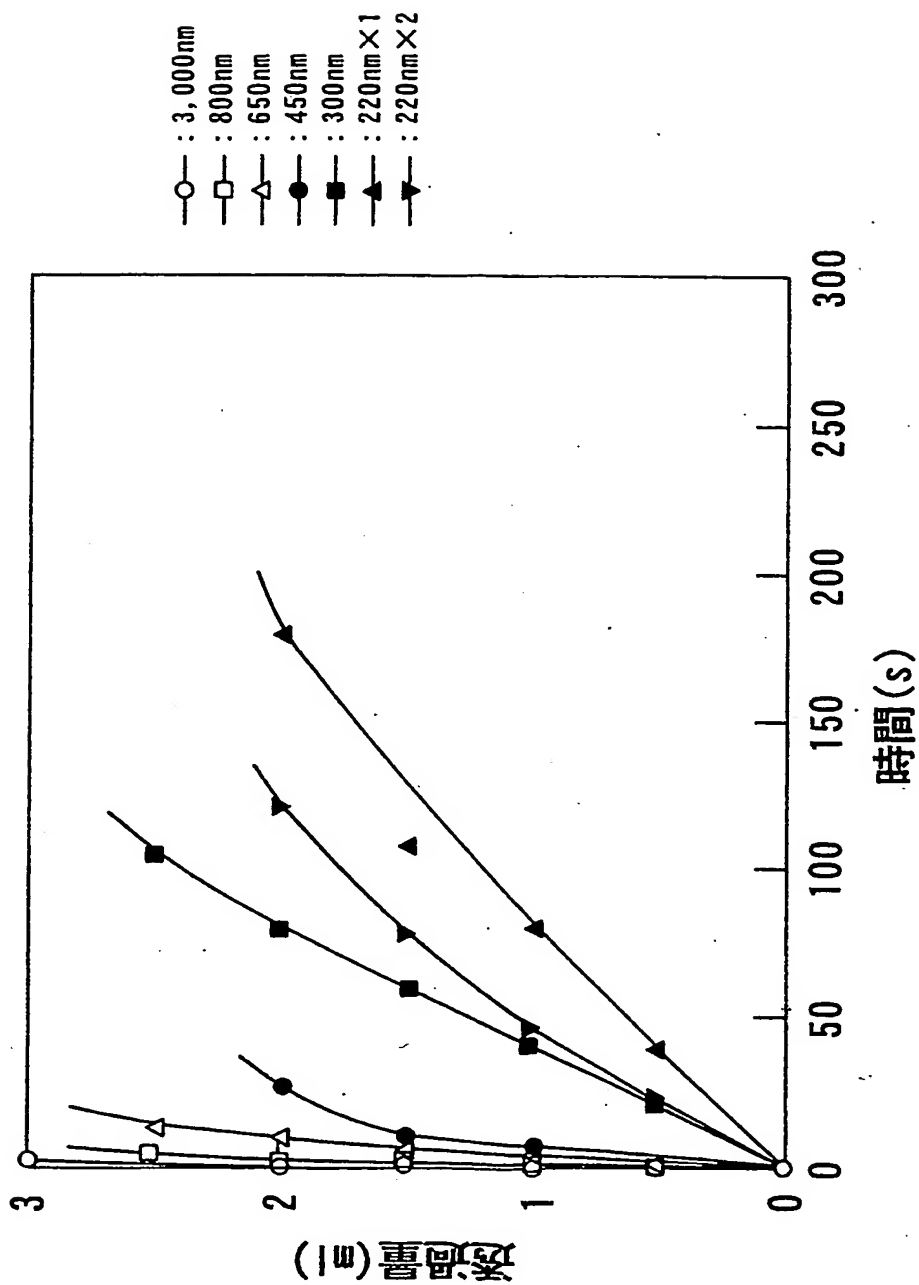
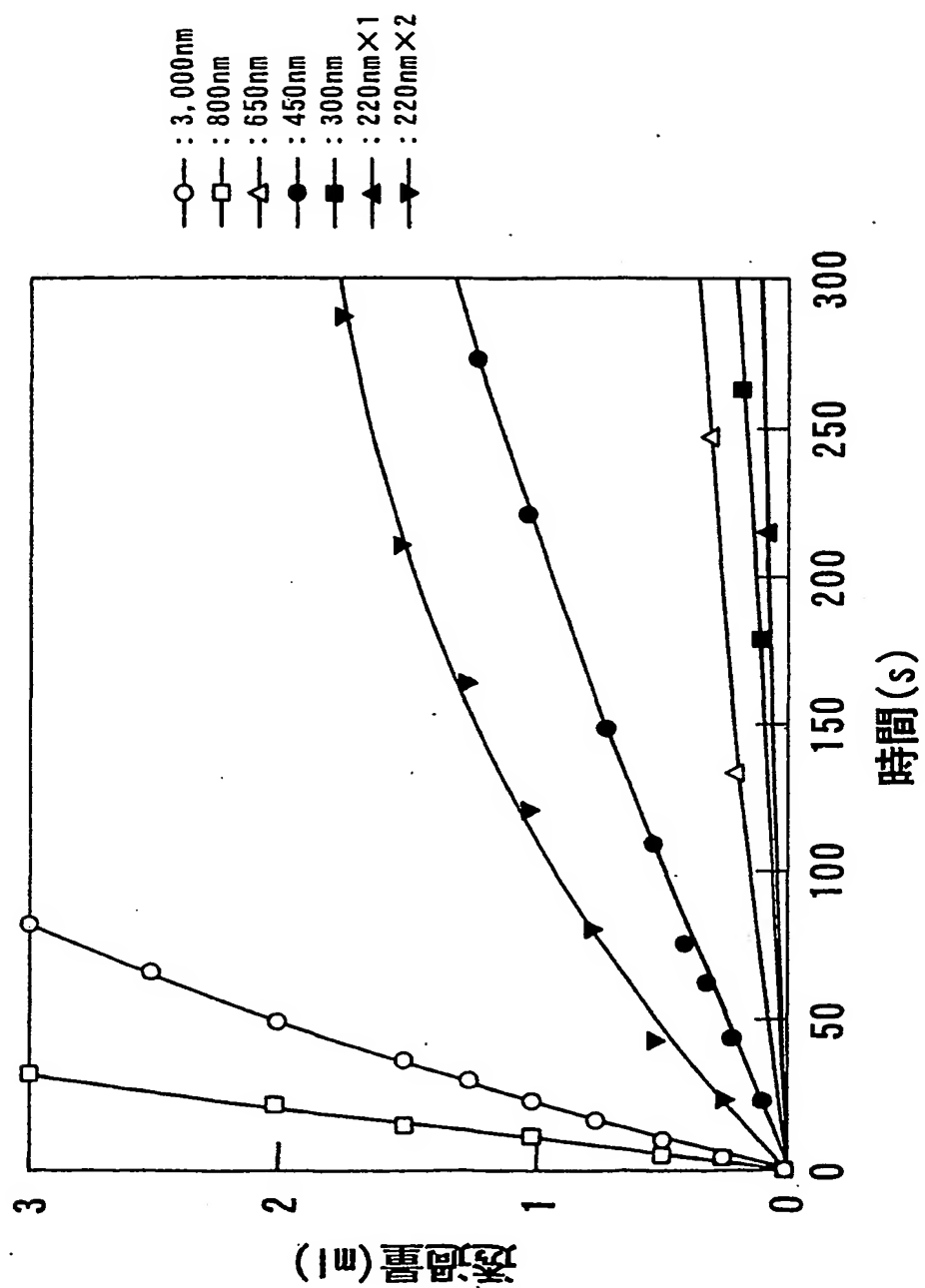


図2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/09828

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K9/127, A61K47/30, B01J13/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K9/127, A61K47/30, B01J13/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 95/12387 A1 (Amgen, Inc.), 11 May, 1995 (11.05.1995), especially, Claims & JP 8-505882 A especially, Claims & AU 9481273 A & EP 678017 A1 & US 5567433 A & CA 2153251 A & DE 69409361 A & ES 2115343 A & MX 192511 A	1-8
Y	JP 57-82311 A (Tanabe Seiyaku Co., Ltd.), 22 May, 1982 (22.05.1982), especially, Claims (Family: none)	1-8
Y	JP 9-87168 A (NOF Corporation), 31 March, 1997 (31.03.1997), especially, Claims; Par. No. [0017], [0034] (Family: none)	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
15 January, 2002 (15.01.02)Date of mailing of the international search report
29 January, 2002 (29.01.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/09828

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5376380 A (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), 27 December, 1994 (27.12.1994), especially, Claims & JP 4-103527 A especially, Claims & CA 2046998 A	1-8
Y	JP 9-208599 A (Green Cross Corporation), 12 August, 1997 (12.08.1997), especially, Par. No. [0020] (Family: none)	1-8
Y	JP 4-5242 A (Terumo Corporation), 09 January, 1992 (09.01.1992), especially, Claims (Family: none)	1-8
A	TAKEOKA, Shinji et al., "Inhibition Effect of Aggregation of Phospholipid Vesicles by Incorporation of Glyco- lipids", J. Colloid. Interface Soc., September, 1992, Vol.152, No.2, pages 351 to 358	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K9/127, A61K47/30, B01D13/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K9/127, A61K47/30, B01D13/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CAPLUS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 95/12387 A1 (AMGEN INC.) 1995. 05. 11, 特に、特許請求の範囲 & JP 8-505882 A, 特に、特許請求の範囲 & AU 9481273 A & EP 678017 A1 & US 5567433 A & CA 2153251 A & DE 69409361 A & ES 2115343 A & MX 192511 A	1-8
Y	JP 57-82311 A (田辺製薬株式会社) 1982. 5. 22, 特に、特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15. 01. 02

国際調査報告の発送日

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

瀬下 浩一

電話番号 03-3581-1101 内線 3490

29.01.02

4P

2939



C.(続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	J P 9-87168 A (日本油脂株式会社) 1997. 3. 31, 特に、特許請求の範囲, 第17段落, 第34段落 (ファミリーなし)	1-8
Y	US 5376380 A (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.) 1994. 12. 27, 特に、特許請求の範囲 & J P 4-103527 A, 特に、特許請求の範囲 & CA 2046998 A	1-8
Y	J P 9-208599 A (株式会社ミドリ十字) 1997. 8. 12, 特に、第20段落 (ファミリーなし)	1-8
Y	J P 4-5242 A (テルモ株式会社) 1992. 1. 9, 特に、特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-8
A	TAKEOKA Shinji et al., Inhibition Effect of Aggregation of Phospholipid Vesicles by Incorporation of Glycolipids, J. Colloid. Interface Soc., September 1992, Vol.152, No.2, pages 351-358	1-8